MÉTODOS USADOS

EN LAS

ESTACIONES DE BIOLOJÍA MARINA

PARA LA

CONSERVACION DE LOS ORGANISMOS ACUÁTICOS.

ADVERTENCIA

Publicamos en el presente número del *Boletin*, los métodos usados en las Estaciones de Biolojía Marina para la conservacion de los organismos acuáticos, halagados con la idea de que a mas de un colega animará a intentar practicarlos ahora que ha llegado el momento de convertir en realidad el proyecto de instalar en el puerto de San Antonio, el Laboratorio Zoolójico marítimo del Pacífico del Sur.

Tomados los materiales del presente trabajo de las obras de los autores mencionados en la pájina siguiente, hemos reservado para nosotros la humilde labor de traducirlos i reunirlos en un solo cuerpo, despues de haber tenido ocasion de conocer bien los métodos usados en la Estacion Zoolójica de Nápoles, durante nuestra permanencia en dicho Laboratorio, como comisionado del Supremo Gobierno.

Ojalá que la publicacion de estos métodos zoolójicos i botánicos pueda prestar algunos servicios i produzca en todo el pais los buenos frutos que de ella hai el derecho de esperar.

B. Q. B.



MÉTODOS USADOS

EN LAS ESTACIONES DE BIOLOJÍA MARINA PARA LA CONSERVACION DE LOS ORGANISMOS ACUÁTICOS

(APUNTES TOMADOS DE LAS OBRAS
DE BOLLES LEE ET HENNEGUY, LO BIANCO I CAPUS ET BOHN) (1)

POR

BERNARDINO QUIJADA B.

A.—ANIMALES

§ 1

CONSERVACION DE LAS DIMENSIONES, LAS FORMAS I LAS APTITUDES NATURALES

Los métodos para preparar los mas delicados animales por la vía húmeda, han sido durante largo tiempo sumamente defectuosos; para convencerse de lo cual no hai mas que ver «el lastimoso esta-

---

(1) ARTHUR BOLLES LEE et L. FÉLIX HENNEGUY, *Traité des méthodes techniques de L'Anatomie microscopique, Histologie, Embryologie et Zoologie*, Paris, 1902.

SALVATORE LO BIANCO, *The methods employed at the Naples Zoological Station for the preservation of marine animals*, Washington, 1899.

G. CAPUS ET G. BOHN, *Guide du naturaliste préparateur et du voyageur scientifique*, Paris, 1903.

do, tan diverso del verdadero, en que se encuentran conservados jeneralmente los animales marinos que forman parte de las colecciones de estudio i de las existentes en los museos».

La publicacion de los verdaderos métodos usados en la Estacion Zoolójica de Nápoles,—hecha en 1890 por Salvador Lo Bianco, inventor de la inmensa mayoría de estos métodos,—ha mejorado grandemente la técnica de la conservacion de los organismos marinos, que cada dia se perfecciona mas i mas con la esperiencia del personal científico de dicho Laboratorio marítimo.

Antes de Lo Bianco, se sumerjia directamente el animal en uno de los líquidos conservadores siguientes: 1.º Alcohol, Espíritu de vino, Ron, Tafia u otro líquido espirituoso fuerte; 2.º Solucion concentrada de sal marina; 3.º Solucion de sal de cocina con alumbre; 4.º Solucion de alumbre mezclado con gran cantidad de agua; 5.º Aguardiente mezclado con ácido bórico o con sal comun o alumbre; 6.º Glicerina; 7.º Aceites, etc.

Despues de Lo Bianco, ántes de sumerjir el animal en alcohol, que es el líquido conservador por excelencia, se somete a reactivos que coagulan el protoplasma, de manera que el organismo conserva su forma i su aspecto al mismo tiempo que los elementos anatómicos se fijan. En esto consiste la operacion importante de la *fijacion.*

En este trabajo pueden presentarse dos casos: ya el *fijador* obra instantáneamente, ántes que el animal haya tenido tiempo de contraerse, o bien obra mas lentamente, i entónces es absolutamente necesario narcotizar previamente el organismo.

En este último caso, se tienen, pues, que llevar a cabo tres operaciones sucesivas: 1.ª La *anestesia;* 2.ª La *fijacion;* 3.ª La *conservacion propiamente dicha.*

Los métodos de Lo Bianco relativos a estas tres operaciones, aunque exijen una larga esperiencia i cierta habilidad operatoria, se practican en todos los laboratorios marítimos; pero es preciso advertir que, fuera de Nápoles, los métodos para la conservacion de los animales, se han perfeccionado i multiplicado mui poco.

Es verdad que, a partir de 1895, se ha excitado mucho el entusiasmo por un «líquido maravilloso», el aldehido fórmico (formalina), que, a la ventaja de su reducido precio, une la de ser a la vez un fijador i un conservador excelente, no sólo de la forma sino de la trasparencia i de los colores de los animales; pero, aunque todavía se hace mucho uso de este líquido, se conocen ahora los inconvenientes que ofrece su empleo en la conservacion ilimitada de los objetos.

I.—ANESTESIA

El naturalista Edmundo Perrier, verdadero predecesor de Lo Bianco, recomienda, desde 1874, un procedimiento de anestesia para impedir que las Lombrices i los Moluscos marinos se contraigan ántes de morir.

Se coloca el animal en un gran vaso de vidrio que contiene agua de mar, en cuyo caso se comporta aquel como en su medio de vida, es decir, con sus tentáculos i todos los apéndices de su cuerpo completamente estendidos.

Se pone despues sobre el líquido—que no debe llenar por completo el vaso, de modo que quede entre su nivel i el borde del mismo un espacio bastante considerable—una pequeña cubeta de vidrio que pueda flotar fácilmente, i se vacian en seguida algunas gotas de **cloroformo** en esta cubeta flotante, tapando al instante el todo con un disco de vidrio.

Como el cloroformo se evapora, satura luego el espacio vacío del vaso i poco a poco se combina con el agua; el animal insensiblemente se narcotiza i no tarda en quedar inmóvil, conservando todos sus órganos estendidos.

Se renueva el cloroformo hasta que la muerte por anestesia se juzgue completa, i despues no hai mas que pasar el animal al alcohol, cuya fuerza se aumenta gradualmente, en cuyo caso, la

cabo de mui poco tiempo, el organismo se halla listo para incorporarlo a la coleccion.

Ademas del *cloroformo* i el *éter*, los anestésicos empleados son: 1.° el *agua dulce* para los animales marinos; 2.° el *alcohol*; 3.° el *hidrato de cloral*; 4.° el *clorhidrato de cocaina*; 5.° el *humo de tabaco* o el *oxalato de nicotina*.

Agua dulce i alcohol.—Agregando poco a poco agua dulce o alcohol al agua de mar, se puede producir la anestesia de los animales que en ella se encuentran.

M. MALARD, de Saint-Vaas-la Hoague, que es un hábil operador, emplea un procedimiento mui sencillo para hacer pasar el al cohol en el agua, valiéndose de una mecha de algodon que tiene una de sus estremidades sumerjida en una probeta llena de alcohol: de la estremidad libre, que está encima i frente de la cubeta que contiene agua de mar, caen las gotas de alcohol, cuyo volúmen i frecuencia dependen del grueso de la mecha.

Estos anestésicos se emplean sobre todo para los Anélidos i los Moluscos marinos.

Hidrato de cloral.—El hidrato de cloral se emplea mui frecuentemente, segun las indicaciones de LO BIANCO, en soluciones débiles, de 1 a 2 %, hechas al instante en el agua de mar, para narcotizar algunos animales, como las *Actinias*, los *Nemertinos* i los *Briozoos*, etc.

Un procedimiento bastante cómodo para usarlo, consiste en hacer flotar en la superficie que contiene estos animales un tapon de corcho plano i agujereado en el centro i echar sobre este flotador las pastillas del anestésico: de esta manera se disuelve poco a poco en el agua.

Clorhidrato de cocaina.—El clorhidrato de cocaina es uno de los mejores anestésicos, i se obtienen resultados excelentes en

los casos de *Hidrarios*, *Briozoos* i *Ascidias*, que son animales mui delicados para preparar. Basta verter la cocaina por pizcas en la superficie del agua de mar, para que se disuelva i difunda poco a poco.

Nicotina.—Lo Bianco ha imajinado un injenioso aparato para narcotizar las Actinias con humo de tabaco. Se recubre con una campana de vidrio el recipiente en que se hallan las Actinias que se quieren narcotizar con el humo. Esta campana está provista de una abertura lateral, por donde penetra el tubo, encorvado en S, de una cachimba metálica llena de tabaco encendido, i en cuya boca se adapta el estremo de un pequeño fuelle.

Si con ayuda de este aparato se llena la campana de humo de tabaco, i se hacen dos fumigaciones, una a las 2 i otra a las 5 de la tarde, es seguro que a la mañana siguiente se obtiene la insensibilidad completa o puede obtenerse fácilmente por medio del cloroformo.

M. Diguet ha empleado con éxito, segun M. Gravier, una solucion al 1 % de oxalato de nicotina.

II.—FIJACION

Para fijar un animal se comienza por colocarlo en un *vaso* de tamaño i forma adecuados (vaso rectangular alargado, pipeta, cuenta-gotas cilíndrico, etc)

Algunas veces es necesario fijar la preparacion por medio de *alfileres ordinarios*, que se sustituyen con *espinas de quiscos* cuando se usan líquidos que los atacan; como se sabe, éstas son inalterables a los reactivos. En todo caso se hace uso, a ejemplo de Lo Bianco, de una pequeña *caja de zinc rectangular* con una capa de cera en el fondo para clavar los alfileres.

Las *espátulas de cuerno* o *grandes pinzas de fierro* o *de laton* son mui cómodas para pasar los objetos de uno a otro recipiente o cambiar el líquido.

Se tendrán, ademas, los principales *instrumentos de diseccion*, como pequeñas *pinzas*, *tijeras*, *escalpelos* i *agujas montadas*.

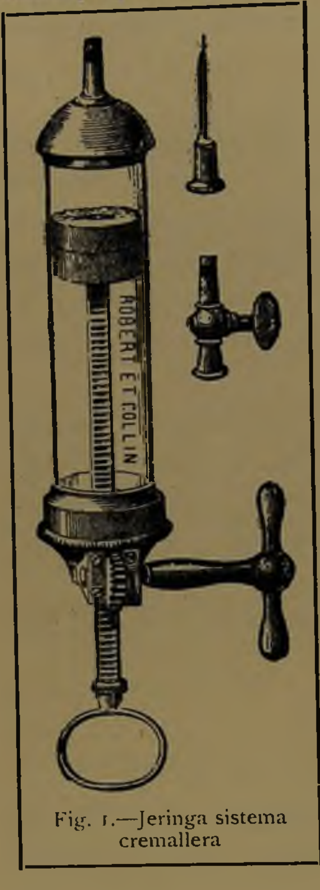


Fig. 1.—Jeringa sistema cremallera

Por fin, en ciertos casos es necesario inyectar en el interior del organismo el líquido fijador i hai que disponer para esto de una *jeringa* especial (*de Pravaz*, o mejor, sistema cremallera (Fig. 1).

Los *fijadores* son soluciones variadas de ácidos o de sales metálicas que se preparan valiéndose de una *probeta graduada* (Fig. 2). Los mas empleados son: 1.º El *ácido crómico* puro o mezclado con otros ácidos; 2.º El *ácido acético*; 3.º El *ácido ósmico*; 4.º El *ácido pícrico* puro o mezclado con ácido sulfúrico (=*líquido de Kleinenberg*); 5.º El *sublimado corrosivo*.

Ácido crómico.—Lo Bianco emplea frecuentemente el ácido crómico al 1 % o una de las mezclas siguientes:

N.º 1......	Ácido crómico al 1 %.........	100 centímetros cúbicos
	Acido acético concentrado...	5 » »
N.º 2......	Ácido crómico al 1 %.........	100 centímetros cúbicos
	Ácido acético concentrado...	10 » »

Uno i otro de estos líquidos son, en jeneral, buenos para fijar los Coralarios, los Equinodermos, los Anélidos, ciertos Opistobranquios i los Moluscos pelájicos (Heterópodos, Pterópodos, Cefalópodos) i tambien los Ascidias.

M. GRAVIER, que ha hecho ensayos con casi todos estos animales, ha obtenido gran éxito valiéndose del *líquido de Perenyi.*

Dicho liquido no es mas que una mezcla de ácido crómico i de ácido nítrico, a la cual se agrega alcohol de 90°. Las proporciones son las siguientes:

Ácido crómico al ½ %..........................	300 centímetros cúbicos
» nítrico al 10 %..........................	400 » »
Alcohol de 90°..........................	300 » »

Despues de la fijacion, son indispensables los lavados, con agua si se ha empleado el ácido crómico, o con alcohol cuando se ha hecho uso del líquido de Perenyi.

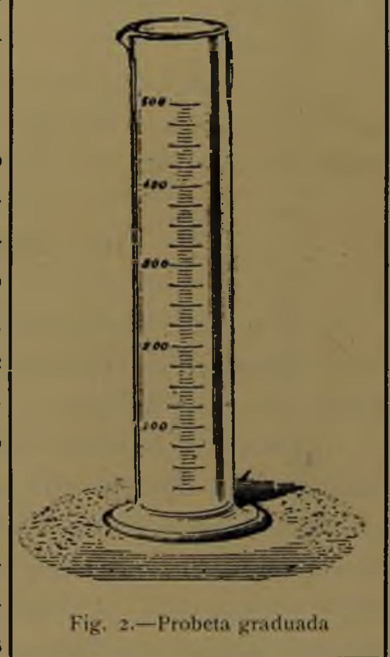


Fig. 2.—Probeta graduada

Ácido acético.—El ácido acético cristalizable «tiene el poder de penetrar instantáneamente en los tejidos i fijarlos», i es bueno emplearlo para matar los animales contráctiles; pero presenta el inconveniente de reblandecer los tejidos si los organismos permanecen en él demasiado tiempo.

Ácidos ósmico i pícrico.—Estos ácidos ofrecen diversos inconvenientes: el primero ennegrece las preparaciones i el segundo pinta de amarillo el alcohol.

El llamado LÍQUIDO DE KLEINENBERG, se hace de la siguiente manera: se mezclan *100 c. c.* de una disolucion acuosa concentrada de *ácido pícrico* con 2 c. c. de *ácido sulfúrico* concentrado: al líquido filtrado se le añade tres veces un volúmen igual de agua destilada.

El inconveniente que presenta de teñir el alcohol de amarillo, aun despues de numerosos lavados, i de no endurecer suficientemente, ha hecho que poco a poco se fuese abandonando, tanto que hoi se usa rara vez i sólo con un fin histolójico.

Sublimado corrosivo.—Es, segun LANG, el fijador por excelencia, pues tiene la doble propiedad de penetrar rápidamente en los tejidos i de endurecerlos bastante. LO BIANCO lo emplea en soluciones concentradas, sea en agua dulce o salada i tanto en caliente como en frio. Como es peligroso respirar los vapores de sublimado hai que evitar que las disoluciones lleguen a la ebullicion, lo mismo que es necesario no tocar con las manos si se tienen en ellas heridas.

Despues de la fijacion de los animales, se lavan con agua dulce i en seguida se sumerjen en *alcohol iodado* (1) hasta que dejen de descolorarse.

III.—CONSERVACION

Los animales fijados se conservan definitivamente en alcohol; pero se pueden fijar i conservar a la vez por medio del aldehido fórmico, formol o formalina.

El *alcohol* debe marcar 70° al areómetro de Gay-Lussac, llamado tambien alcoholómetro centesimal (Fig. 3) porque la escala está dividida en 100° que espresa en centímetros la cantidad de alcohol absoluto que contiene el líquido ensayado: el cero corresponde al agua pura i el número 100 al alcohol absoluto. Tambien se puede emplear el areómetro de Beaumé, que tiene una graduacion del todo diferente.

(1) Sus proporciones son las siguientes:

Alcohol de 35° o de 70°	100 c. c.
Tintura alcohólica de iodo	2,5 c. c.

Cuando los animales son blandos i jelatinosos, se comienza por dejarlos de dos a seis horas en alcohol de 35° o 50°, segun su mayor o menor consistencia, i despues se pasan a alcohol de 60° o bien directamente al de 70°.

Sólo en algunos casos especiales se usa el alcohol de 90°.

El *formol* o *formalina* se prepara de la siguiente manera: se toma 3, 4, 5 % de la solucion comercial de aldehido fórmico (que contiene por sí mismo 40 % de aldehido puro) i se completa por el agua.

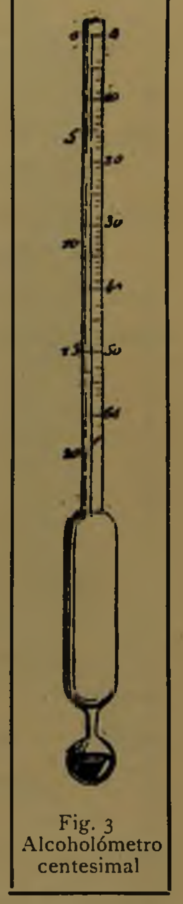


Fig. 3
Alcoholómetro centesimal

Si es verdad que el formol conserva la trasparencia i los colores de ciertos organismos, a la larga disuelve las sustancias calizas i produce la maceracion de muchos tejidos. No se puede, pues, conservar en este líquido los animales que tienen un integumento impregnado en sales calcáreas, como los moluscos, por ejemplo, sobre todo los moluscos árticos, con concha de poco espesor.

Al cabo de cierto tiempo, las escamas de los Peces conservados en formalina se caen i los Anélidos se descomponen. Para evitar esta destruccion de los tejidos, se pueden tomar ciertas precauciones: 1.° servirse de agua destilada para la preparacion de la solucion de formol; 2.° no dejar esta solucion espuesta al aire i a la luz (vasos completamente llenos i cuidadosamente cerrados, pantallas de papel negro); 3.° mezclar el alcohol i el formol en diversas proporciones.

Se ha constatado que se pueden conservar perfectamente los objetos animales, a lo ménos seis años, en formalina.

§ 2

PARTICULARIDADES RELATIVAS A LOS DIVERSOS ANIMALES

Los procedimientos de anestesia, fijacion i conservacion, varian de un grupo a otro i algunas veces en un mismo grupo de una a otra especie.

No hai regla fija, i sólo despues de una larga esperiencia se puede llegar a obtener buenos resultados.

No daremos sino algunas recetas aplicables a los grupos en jeneral, insistiendo en los métodos esencialmente prácticos que conviene emplear con los animales mas comunes.

I

VERTEBRADOS

Peces.—Para fijar los Peces con la verdadera apariencia de una vida i duracion perpetua, esto es, con las formas del cuerpo i las aletas bien distendidas, se deben meter aun *vivos* en la solucion comercial de formalina, que es el líquido fijador por excelencia. En seguida se les conserva definitivamente en la misma formalina al 5% o en alcohol de 70°.

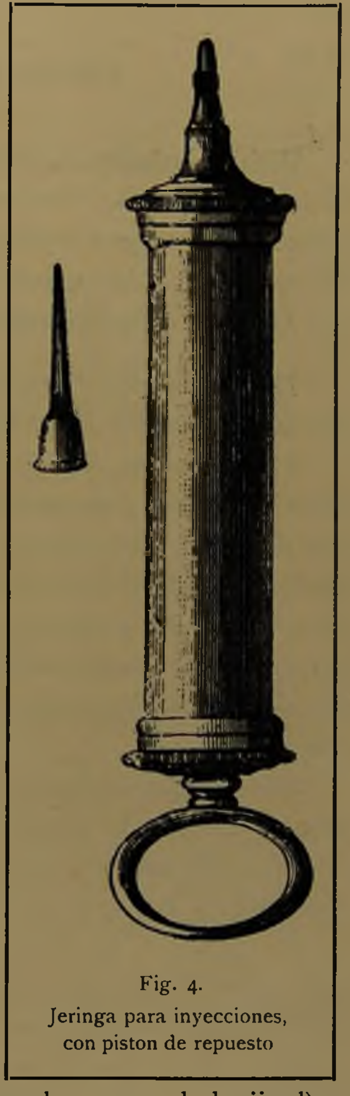
Como en los *Teleósteos* el alcohol penetra difícilmente en los intestinos, sobre todo cuando son grandes, es preciso hacerles una incision en el vientre o bien se les inyecta alcohol de 90° en todo el tubo dijestivo, por el ano, con la ayuda de una jeringa de piston (Fig. 4).

Las especies de piel plateada de estos Peces se fijan algunos minutos en sublimado concentrado.

Los *Selacios* i los *Ciclóstomos* pequeños se sumerjen directamente

en alcohol de 70°. En las formas grandes en necesario inyectar el alcohol en el cuerpo i renovar mui a menudo el líquido.

Los grandes Selacios, si se quieren conservar por algunos meses, para luego preparar el esqueleto o conservar la piel, se deben sumerjir en una solucion de cloruro de sodio al 10 por ciento, una vez estraidos los intestinos, abriendo el vientre.


Fig. 4.
Jeringa para inyecciones, con piston de repuesto

Algunas especies de consistencia blanda, como el *Torpedo* o *Raya*, se fijan mejor dejándolas media hora en el ácido crómico al 1 por ciento.

Los *embriones* de Selacios (de 1 a 10 cm. de lonjitud) se fijan con sublimado concentrado en que se dejan 5 a 15 minutos, teniendo luego cuidado de lavarlos bien con alcohol iodado. Así preparados, pueden servir tambien para investigaciones histolójicas.

Lo Bianco ha conservado bastante bien embriones de *Torpedo* con toda la masa vitelina, poniéndolos en una mezcla de ácido crómico al 1 por ciento i sublimado concentrado en partes iguales, durante quince minutos, i pasándolos despues al alcohol débil.

Los embriones mas grandes (de mas de 10 cm. de lonjitud), se dejan próximamente una hora en ácido crómico al 1 por ciento, lavándolos con agua dulce ántes de pasarlos al alcohol.

II

PROTO-VERTEBRADOS

Cefalocordados *(Leptocardios).*—Para preparar el *Amphioxus* con los cirros bucales bien estendidos, se mata con agua de mar alcoholizada al 10 por ciento, i despues de muerto, lo cual sucede ordinariamente a los pocos minutos, se pasa al alcohol de 50°, cuya fuerza se eleva gradualmente a 70°.

Urocordados *(Tunicados).*—Los Perenicordados o *Appendicularias* se fijan por el sublimado acidulado por el ácido acético.

Para matar las *Ascidias simples* con sus orificios abiertos, se narcotizan en una disolucion de hidrato de cloral (1 por ciento en el agua del mar), en la que se dejan de 6 a 12 horas, i se fijan en seguida en ácido acético mezclado con un décimo de ácido crómico, e inmediatamente despues se pasan al ácido crómico al 1 por ciento, con el cual se hace tambien una inyeccion por la boca de cada individuo; media hora mas tarde se pasan al alcohol de 35° i despues al de 70°.

Las *Ascidias compuestas* jelatinosas se narcotizan un par de horas en hidrato de cloral al 1 por ciento i se matan vertiendo despues sublimado concentrado caliente, pasándolas en seguida al ácido crómico al ½ por ciento, en el que permanecen media hora.

Caullery (1) las narcotiza con la cocaina, (segun Lahille algunas gotas de una solucion al 5% agregadas a 30 c. c. de agua de mar) i despues las fija en el ácido acético, pasándolas en seguida al alcohol de 70°. Lo Bianco mata las *Salpas duras* (2) con el áci-

(1) *Bull. Sc. France Belg.*, XXVII.

(2) «Muchas veces las Salpas, cuando están sumerjidas en el líquido fijador, se contraen muchísimo, cierran los orificios i en esta posicion mueren. Esto se evita introduciendo una varilla de vidrio por uno de los

do acético al 10 %; las *semiduras* con el ácido crómico al 1 % mezclado con 5 % de ácido acético, i las *blandas* con el ácido crómico al 1 % con 0,02 % de ácido ósmico, o con formol. Por fin, fija los *Doliólidos* con sublimado concentrado, con la mezcla cromo-ósmica, o con una mezcla de diez partes de la solucion de sulfato de cobre al 10 % con una de sublimado concentrado.

Hemicordados.—*(Enteropneustas).*—Lo Bianco fija el *Balanoglossus* con el ácido picro-sulfúrico o el ácido crómico al 0,5 % despues de insensibilizarlo por el alcohol agregado al agua de mar.

La larva *Tornaria* se mata con la mezcla de sulfato de cobre i sublimado (1), i tambien se puede lograr bien con el sublimado solo o la mezcla cromo-ósmica.

III

MOLUSCOS

Los Moluscos se narcotizan agregando alcohol o agua dulce al agua de mar. Se opera lentamente i de ordinario se consigue la insensibilidad completa al cabo de dos o tres dias.

En seguida se puede sumerjirlos directamente en alcohol de 70 grados *(Lamelibranquios)*, o bien se les mata por el ácido acético cristalizable para ponerlos desde luego en alcohol débil (muchos *Gastrópodos)*.

Los *Opistobranquios* i los *Pterópodos* pueden fijarse con el líquido de Perenyi.

---

orificios, i así, penetrando el líquido, el animal toma su forma natural». (Lo Bianco).

(1) Mezcla de caparrosa azul i sublimado.................... { Sulfato de cobre al 10 %.... 100 c. c. / Sublimado a saturacion...... 10 c. c. }

Para los *Cefalópodos* conviene mucho la formalina: no hai mas que sumerjirlos directamente en este líquido conservador.

Lamelibranquios i Gastrópodos

Los **Lamelibranquios,** cuando se les saca del agua para sumerjirlos en un líquido fijador, retiran sus sifones i su pie, cierran sus valvas i mueren en estado de contraccion. Si en seguida se emplea la fuerza para abrir la concha, se côrre el riesgo de romper el manto i se encuentra que es casi imposible hacer estender el pie i los sifones. DE CASTELLARNAU (1) recomienda hacerlos morir agregando gota a gota en la superficie del agua en que se encuentran, ya sea alcohol o la mezcla de alcohol, glicerina i agua de mar de LO BIANCO. (2).

Es preciso agregar el alcohol o la mezcla gradualmente, vertiendo mui poco a la vez, de modo de no ajitar el agua donde se encuentran los animales, pues es necesario que la difusion del alcohol se opere mui lentamente. La operacion puede durar algunas horas, pero se obtienen buenos resultados. Los animales, ántes de morir, entran en un estado de estupor que les quita la facultad de contraerse; al contrario, estienden ámpliamente su pie, sus sifones, sus branquias i sus tentáculos i mueren con la concha abierta. Despues, una vez conseguida la insensibilidad, se les puede matar en su posicion natural echándolos en el ácido picro-sulfúrico (líquido de Kleinenberg) o en otro fijador rápido.

—Los mismos procedimientos dan jeneralmente buenos resultados para los **Gastrópodos**.

LO BIANCO narcotiza los *Prosobranquios*, i, entre los *Heterópodos* los *Atlántidos*, agregando gradualmente alcohol de setenta grados.

---

(1) *La Estacion Zoolójica de Nápoles*, etc, Madrid, 1885

(2) Glicerina, 20 partes; alcohol (70 %), 40 partes; agua de mar, 40 partes

Para los *Opistobranquios* se recomienda el líquido de Perenyi.

Los *Aplisios* pueden narcotizarse ántes por una inyeccion subcutánea de 1 c. c. de solucion de clorhidrato de cocaina al 5 ó 10 por ciento.

Para los *Pterópodos* en jeneral se recomienda tambien el líquido de Perenyi. *Creseis* es una forma de difícil preparacion. Lo Bianco emplea el método del alcohol. El mismo autor narcotiza los *Gimnosomos* con el hidrato de cloral al 0,1 por ciento.

Para la conservacion de los Heterópodos i Pterópodos, la formalina es admirable despues de la fijacion por un líquido crómico o el sublimado, al ménos en cuanto a las apariencias macroscópicas, i, bajo este respecto, es mui superior al alcohol.

IV

ARTRÓPODOS

Crustáceos.—En jeneral los Crustáceos pueden sumerjirse directamente en alcohol de 70°.

Para evitar que se desprendan los apéndices en los *Decápodos*, se hacen morir en agua dulce ántes de ponerlos en alcohol, dejándolos solamente el tiempo necesario; de lo contrario se inflarian los apéndices membraniformes.

Para los *Pagúridos* es preciso tener cuidado de cambiar mucho el alcohol i conservarlos definitivamente en alcohol de 90°, porque la piel de su abdómen es mui poco permeable.

Algunas especies se fijan mui bien con el sublimado. Este reactivo puede ser empleado con ventajas, por ejemplo, para los *Copépodos*, para las larvas de los Decápodos, etc. Sin embargo, algunos Copépodos *(Copilia, Sapphirina)*, lo mismo que los *Ostrácodos*, se dejan conservar mucho mejor con el ácido ósmico (débil). En muchos casos, el tratamiento por el ácido ósmico, da una dife-

renciacion suficiente de los elementos histolójicos, de modo que no es necesario recurrir a una coloracion ulterior *(Copilia, Phyllosoma)*.

Müller (1) fija los Ostrácodos en una mezcla de 4 partes de éter con 1 de alcohol absoluto, pasándolos despues al alcohol de 70 por ciento.

Giesbrecht usa para los Copépodos marinos una solucion concentrada de ácido pícrico en el agua de mar.

Conviene, i es con frecuencia necesario, emplear los reactivos en caliente, sobre todo los líquidos de fijacion i lavado.

V

EQUINODERMOS

Equinoídeos i Asteroídeos.—Para preparar los *Erizos* i *Estrellas de mar* con los pies ambulacrales bien estendidos, Lo Bianco los pone en un poco de agua de mar con la boca hácia arriba, i los mata despues vertiendo encima una mezcla de 10 partes de ácido acético i 1 de ácido crómico al 1 por ciento, i al instante los pasa al alcohol débil para evitar que el ácido ataque la materia caliza del dermo-esqueleto.

Para el estudio anatómico de los Erizos, se deben practicar en el dermo-esqueleto dos pequeños agujeros opuestos, para hacer salir todo el líquido que contienen dentro, i despues pasarlos al alcohol i hacer que éste rellene toda la cavidad interna. Al pasar el animal al alcohol mas fuerte, se tendrá cuidado de cambiar tambien el de adentro. Las formas pequeñas se sumerjen directamente en alcohol de 70° sin agujerearlas (Lo Bianco).

Si se quieren conservar en seco los Erizos de mar, despues de haber hecho salir el agua que contienen, se pondrá en alcohol de

---

(1) *Fauna Flora Golf Neapel*, XXI, 1894, páj. 8.

70° por uno o dos dias i despues se dejarán secar al aire o al sol (Lo Bianco).

Hamann (1) recomienda matar los Asteroídeos por medio de una inyeccion con el ácido fijador. Se introduce la jeringa debajo de la piel de la estremidad de uno de los brazos i se inyecta así el reactivo en la cavidad del cuerpo.

Bien pronto los pies ambulacrales i las branquias se estienden, i cuando se juzgue que el líquido inyectado haya penetrado por todas partes, se pone el animal en cierta cantidad del mismo reactivo.

Las larvas de los Erizos o *Pluteus* i las de las Estrellas de mar o *Bippinnaria*, se fijan por medio de una solucion fria i saturada de sublimado, en la cual se las deja dos o tres minutos.

Ofiuroideos.—Los *Ofiuroideos* deben matarse en agua dulce si se desea evitar la desarticulacion de los brazos. Las especies pequeñas se hacen morir en alcohol débil.

Russo fija *Ophiothrix* durante una o dos horas en el ácido ósmico al 0,5 por ciento i descalcifica en el líquido de Müller durante seis a diez dias.

Holoturioídeos.—Como a todos los animales que hai que hacer distender, se ponen los *Pepinos de mar* o *Phyllophorus* en agua de mar limpia. Una vez que los tentáculos se estienden bien, se coje el animal apretándolo con los dedos (2) un poco por debajo de los tentáculos, se saca así del agua de mar i se sumerje su parte anterior en un recipiente algo profundo que contenga ácido acético concentrado. Al mismo tiempo otra persona debe inyectar alcohol a 90° con una jeringa cuya cánula se introduce por la abertura anal del animal; se echa el alcohol sin gran presion para evitar que se hinche demasiado todo el cuerpo del animal; apénas muerto, se po-

---

(1) *Beitræge zur Hist. d. Echinodermen*, Hft, 2, 1885, páj. 2.

(2) Si los individuos son mui pequeños, la presion por el cuello no se hace con los dedos sino con una pinza.

ne en alcohol de 70°, cerrando el orificio anal con un taponcito de corcho para evitar que, saliendo el líquido del esterior, se deshinche el cuerpo. Las inyecciones se han de repetir cada vez que se mude el alcohol.

La formalina se presta tambien admirablemente para la conservacion de los Holoturioídeos.

El procedimiento que hemos dado a conocer para las larvas de los Equinoídeos, es tambien aplicable a las *Auricularias* de los Holoturioídeos.

Crinoídeos.—Lo Bianco fija *Antedon rosacea* en alcohol de 70 por ciento i *A. phalangium* en alcohol de 90 por ciento.

La narcotizacion de las formas larvales por el hidrato de cloral ántes de la fijacion, presta mui buenos servicios, especialmente para el estudio de los *Pentacrinus*. Se endurecen despues con el alcohol.

Para el desarrollo embrionario de la *Comatula*, el método que mas se recomienda consiste en fijar por el líquido de Lang o sublimado corrosivo.

VI

VERMES o GUSANOS (1)

A.—Gusanos en el sentido estricto de la palabra

1

ANELIDOS

Despues de narcotizados por el alcohol o el cloroformo, se fijan los Anelidos sumerjiéndolos en el líquido de Perenyi. M. Gra-

(1) M. de Ribaucourt aconseja para los *Vermes de tierra* sumerjirlos durante nueve a doce horas en el líquido de Gilson, cuya composicion es la siguiente:

VIER ha aplicado con éxito este método a los Poliquetos, Oligoquetos e Hirudíneos. Se dejan en el líquido fijador durante dos o tres horas, segun el tamaño de la especie, i despues se pasan los animales fijados al alcohol de 70 grados, que se renueva continuamente.

Quetópodos.—Para estender i fijar los Quetópodos, KÜKENTHAL pone los animales en un vaso cilíndrico lleno de agua a una altura de 10 centímetros, i vacia sobre el agua una capa de alcohol a 70 por ciento, de 1 a 2 centímetros de espesor. Despues de cuatro a ocho horas, se encontrarán los animales narcotizados i se les podrá fijar.

PERRIER recomienda poner sobre el agua del cristalizador que contiene los animales, un vidrio de reloj con cloroformo i cubrir el todo. La anestesia se produce en media hora.

COLLIN (1) procede casi del mismo modo con el *Criodrilus lacuum*, suspendiendo en el recipiente un pedazo de papel secante empapado en cloroformo.

CERFONTAINE (2) inyecta en los *Lumbricus*, por picadura hipodérmica, dos centímetros cúbicos de una solucion de curare a 1:500. En seguida pone los animales en el agua i al cabo de un cuarto de hora consigue matarlos.

Segun LO BIANCO se puede producir una buena narcotizacion de los Poliquetos por medio del agua de mar que contenga 5 por ciento de alcohol.

Los *Polychaeta sedentaria* ofrecen el inconveniente de poseer

---

Alcohol al 60%	50 centímetros cúbicos
Sublimado	15 gramos
Ácido acético cristalizable	2 centímetros cúbicos
Agua	500 gramos.

(1) *Zeit. f. wiss Zool.*, XVLI, 1888, p. 474.
(2) *Arch. de Biol.*, XX, 1890, p. 327.

un aparato branquial complicado i estremadamente contráctil. Se obtienen frecuentemente buenas fijaciones en estension sumerjiendo los animales bruscamente en una solucion de sublimado. Es preciso tomar una solucion *fria*, pues las soluciones en caliente de ordinario hacen encojerse las branquias.

Las especies de *Polichaeta errantia*, que poseen branquias contráctiles, como *Eunice* i *Onuphis*, pueden ser tratadas de la misma manera.

Lo Bianco recomienda matar los *Chaetopteridae*, *Sternaspidae*, *Spirographis* i *Protula*, poniéndolos una media hora en el ácido crómico al 1 por ciento. Reconocemos que este procedimiento produce una buena estension del animal, pero dudamos que la conservacion histolójica sea tan buena como la que se produce con el sublimado. (A. B. L.)

Se puede obligar a los Anélidos sedentarios a estenderse fuera de sus tubos poniéndolos durante algunas horas en el agua de mar que contenga 0,1 por ciento de hidrato de cloral (Lo Bianco).

Rievel (1) fija en estension a los *Ophryotrocha* por medio del líquido de Lang caliente, i para los *Lumbricus* se vale del sublimado alcohólico caliente o del ácido picro-sulfúrico caliente, dejándolos de diez a quince minutos en estos líquidos.

Gefireos.—Para preparar el *Sipunculus nudus* es preciso, segun Vogt i Yung (2), vaciar el intestino de los animales durante algunos dias en el agua de mar pura en fuentes de fondo pulimentado (hai que tener cuidado de cambiarlas todos los dias, pues tragan de nuevo la arena espulsada). El mejor ajente para matarlos en estension es el cloroformo.

Ward (3) pone los animales en una cubeta con agua de mar

---

(1) *Zeit. wiss. Zool*, LXII, 1896, p. 292.
(2) *Anat. com. prat.*, p. 373.
(3) *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*, XXI, 3, p. 144.

i vacia sobre el agua una delgada capa de alcohol al 5 por ciento. Los animales se insensibilizan al cabo de 4 a 8 horas.

Lo Bianco dice que el ácido crómico al 0,5 por ciento o el hidrato de cloral al 0,1 por ciento en el agua de mar, pueden dar buenos resultados, pero uno i otro método son inciertos.

Phascolosoma i *Phoronis* deben ser tratados por el procedimiento del alcohol.

Priapulus i *Halicryptus*. Apel recomienda matarlos o bien poniéndolos en el agua de mar, a la que se hace tomar gradualmente una temperatura de 40 grados C (no mas subida), o bien sumerjiéndolos bruscamente en agua hirviendo, en la que se les mantiene un instante. Esta maniobra no mata los animales, pero los paraliza, i les impide contraerse miéntras se les somete a la accion de un reactivo fijador. Apel recomienda el ácido crómico al $\frac{1}{3}$ por ciento, el ácido picro-sulfúrico, el bicromato de potasio i el alcohol. El ácido ósmico no penetra suficientemente.

2

NEMATELMINTOS

Nematodes.—La cutícula resistente de los Nematodes opone frecuentemente un gran obstáculo a la penetracion de los reactivos. Segun Loos (1) se puede subsanar este inconveniente tratando los animales (o sus huevos, que presentan la misma impermeabilidad) por el agua de Jovel o el agua de Labarraque.

Para la fijacion, la mayoría de los autores recomiendan el sublimado; el ácido crómico tiene la tendencia de poner los animales frájiles.

Lo Bianco toma para las formas marinas el sublimado concentrado o el ácido picro-sulfúrico.

---

(1) *Zool. Anzeig.*, 1885, p. 333.

AUGSTEIN (1) ha encontrado que para el *Strongylus filaria* el mejor fijador es el ácido picro-nítrico de MAYER.

VEJDOVSKY (2) aconseja para *Gordius* el ácido crómico al 0,5 por ciento durante 24 horas.

Acantocephalos.—*(Echinorhynchus)*.—La mejor manera de matar los animales es ponerlos en el ácido ósmico al 0,1 por ciento, mas o ménos: viven largo tiempo, se contraen durante las primeras horas, pero se estienden completamente ántes de morir.

Se puede emplear tambien el ácido crómico al 0,1 por ciento: los animales viven algunos dias, pero mueren al fin perfectamente estendidos. Este es el mejor reactivo para el estudio de la subcutícula.

KAISER (3) indica los dos fijadores siguientes: 1.) Solucion saturada de cianuro de mercurio en agua caliente a 45° o 50° C (15 a 60 minutos, lavado en el alcohol a 70 por ciento); 2.) Acido pícrico, 1; ácido sulfúrico, 10; ácido crómico, 1; agua, 100. Calentar a 55 grados C; dejar obrar 15 a 20 minutos, lavar 5 a 10 minutos en el agua caliente i despues en alcohol de 60 por ciento.

HAMANN asegura haber obtenido mui buenos resultados con el sublimado i tambien con el alcohol que contenga un poco de cloruro de platino.

3

PLATIELMINTOS

Turbelarios.—Para los *Rhabdocelos*, BRAUN (4) procede así: pone un animal sobre una lámina porta-objetos, lo aplasta lije-

---

(1) *Arch. Naturg*, LX, 1894, p. 645.

(2) *Biblioth. Zool.*, VII, 1, 1891; *Zeit. f. wiss Mik.*, VIII, 3, 1891.

(3) *Gena Zeit. Naturw.*, XXV, 1890, p. 113; *Zeit wiss. Mik.*, VIII, 1891, p. 209.

(4) *Zcit. f. wis. Mik.* III, 1886, p. 398.

ramente por medio de un cubre-objetos i lo mata introduciendo entre los dos vidrios una mezcla de tres partes del líquido de Lang con una parte de la solucion de ácido ósmico al 1 por ciento. Otros ajentes fijadores no le han dado buenos resultados.

Böhmig (1) dice que para ciertos tejidos, tales como los músculos i el parenquima del cuerpo, el ácido nítrico i el ácido picro-sulfúrico son mui útiles.

Para los *Rhabdocœles acœles*, Delage recomienda mucho la fijacion por medio de una mezcla de ácido ósmico i de carmin amoniacal. Otro fijador excelente es la solucion concentrada de sulfato de fierro. Los animales *(Convoluta)* mueren perfectamente estendidos.

Para los *Dendrocelos* de agua dulce, Chichkoff recomienda la mezcla siguiente: sublimado al 2 por ciento, 6 partes; ácido acético al 15 por ciento, 4 partes; ácido nítrico, 2 partes; cloruro de sodio al 14 por ciento, 8 partes; alumbre al 2 por ciento, 1 parte.

Lo Bianco mata los *Rhabdocelos* i *Dendrocelos* por el sublimado caliente, los pone en seguida en el agua fria i de allí en el alcohol. Para ciertos *Polyclades* el sublimado debe emplearse tibio.

Voigt (2) mata las *Planarias* sumerjiéndolas en una mezcla de 1 parte de ácido nítrico concentrado i 3 de agua, i despues de un minuto, las pone en el alcohol a 70 o 90 por ciento.

Trematodes.—Lo Bianco fija los Trematodes por el sublimado concentrado caliente (3).

Looss (4) toma para la *Bilharzia* una solucion de 1 por ciento de sublimado en alcohol a 70 por ciento, calentada a 50° o 60° C.

Bertendorf (5) ha obtenido buenos resultados con el *Disto-*

---

(1) *Zeit. f. wis. Mik.* III, 1886.

(2) *Verh. Nat. Ver. Bonn*, 1896. p, 118.

(3) El mismo procedimiento se emplea para matar los **Cestodes.**

(4) *Arch. Mik. Anat.*, 1895, p. 7.

(5) *Zool. Jahrb., Abth. Morph.* X, 1897, p. 308.

num hepaticum por el método rápido de Golgi, pero prefiere el azul de metileno.

SCHWARZE (1) ha encontrado que el único medio de conservar los tejidos de las *Cercarias*, consiste en fijarlas en una solucion saturada de sublimado, calentada a 35° o 40° C.

Nemertinos.—Los Nemertinos son mui difíciles de fijar. Despues de una larga esperiencia en este grupo, debemos decir que no hemos podido encontrar ningun método que lleve con seguridad al objeto. Hemos obtenido nuestros mejores resultados fijándolos por el sublimado (sol. sat. en frio, con 1 por ciento de ácido acético).

Es bueno cortar primero la cabeza del animal i proyectar los trozos que se quieren fijar—los cuales no deben ser demasiado largos—tan rápidamente como sea posible en la solucion de sublimado; es una maniobra que es necesario aprender i que no siempre da buen resultado. Decapitamos los animales, porque hemos observado que las contracciones son mucho ménos enérjicas en los troncos cuando no están en comunicacion con los ganglios cerebrales.

Hemos ensayado la mayor parte de los otros fijadores en uso, líquidos ósmico, crómico, etc., i no los recomendamos; es necesario evitar sobre todo los líquidos crómicos i el percloruro de fierro, pues parece que obran como irritantes i provocan contracciones musculares de una violencia tal, que los tejidos se deterioran; ademas, los animales mueren en estos líquidos mucho ménos lijero que en el sublimado.

DE CASTELLARNAU dice que se pueden matar los Nemertinos por medio de la anestesia gradual por el alcohol, lo mismo que los Moluscos.

Hemos ensayado el procedimiento de FOETTINGER por medio del hidrato de cloral (2): las especies con las cuales hemos manipu-

---

(1) *Zeit. f. wiss Zool.*, 1885, p. 45.
(2) *Archiv. Biol.*, VI, p. 115, 1885.

lado, mueren mas o ménos estendidas, pero con la trompa escupida.

Lo Bianco obtiene, sin embargo, buenos resultados con una solucion al 0,1 a 0,2 por ciento en el agua de mar.

El Prof. Du Plessis nos indica el agua dulce caliente, casi hirviendo, como el mejor medio de matar los Nemertinos en la mayoría de los casos, pues conserva bastante bien los tejidos.

Dendy (1) ha obtenido buenos resultados con *Geonemertes*, esponiéndolo durante medio minuto a los vapores del cloroformo.

4

ROTÍFEROS

Para la observacion de los animales vivos, la narcotizacion presta grandes servicios.

Vogt i Yung recomiendan una solucion de una u otra de las sales solubres de estricnina.

Weber (2) prefiere una solucion al 1 por ciento de clorhidrato de cocaína.

Los procedimientos de Eismond i Jensen (3) pueden prestar servicios.

---

(1) Voy. *Journ. Roy. Mik. Soc.*, 1893, p. 116,

(2) *Arch. de Biol.*, VIII, 4, 1888, p. 713.

(3) Eismond ha propuesto un medio mecánico para inmovilizar los pequeños organismos (Vermes i Crustáceos, Infusorios). Agrega al agua en la cual se observan, una gota de solucion espesa de goma de cereza «Kirschleim» (la goma arábiga no conviene). Cuando la operacion es bien hecha, los animales mueren fijos en su lugar, pero el movimiento de los cilios ni ninguna funcion vital se manifiesta.

Un procedimiento parecido ha sido elaborado por Jensen: Hace, con la ayuda del calor, una solucion de 3 gramos de jelatina en 100 c. c. de agua ordinaria. La solucion no es líquida a la temperatura ordinaria. Para servirse de ella, se la calienta lijeramente, se agrega una gota al agua que contiene los organismos en un vidrio de reloj i se mezclan los dos líquidos.

HARDY (1) emplea el jarabe espeso.

Preparaciones permanentes de Rotíferos se pueden hacer por el método de ROUSSELET: Se juntan los animales en un vidrio de reloj i se narcotizan agregando a intervalos unas gotas de una mezcla de:

Sol. de clorhidrato de cocaína al 2 %	3	partes.
Alcohol al 90 %	1	»
Agua destilada......................................	6	»

Se les observa bajo el microscopio, i cuando los cilios han cesado de moverse o están a punto de paralizarse, se agrega una gota de líquido de Flemming o de ácido ósmico al 0,25 %. Se espera un medio minuto o ménos para que la fijacion termine, se sacan los animales con la ayuda de una pipeta i se les lava pasándolos a dos o tres vidrios de reloj llenos de agua destilada. Se les mata definitivamente en una mezcla de 2½ partes de formalina con 37½ de agua destilada.

ZOOGRAF (2) narcotiza como ROUSSELET, pero suprimiendo el alcohol, i fija por el ácido ósmico durante dos o cuatro minutos, pasa a una mezcla de 1 parte de ácido piroleñoso bruto con 8 a 10 de agua i despues de cinco a diez minutos lava a varias aguas i pasa de los alcoholes graduados a la glicerina o al bálsamo.

CONSER (3) narcotiza con la cocaína i fija con la formalina al 20 % seguido de ácido crómico al 0,5 %.

B.—Briozoos

Hai varios métodos de estension i de fijacion para los Briozoos. Se obtienen excelentes resultados cuando, despues de insen-

(1) *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1889, p. 475.
(2) *C. R. Acad. d. Sc.*, CXXIV, 1897, p. 245.
(3) *Trans. Amer. Mic. Soc.*, XVII, 1896, p. 310.

sibilizarlos con la cocaína, se les sumerje durante un minuto en el ácido acético cristalizable i se pasan despues al alcohol de 70°.

RICHARD se sirve de una solucion de clorhidrato de *cocaina* al 1 %. Se colocan los animales en un vidrio de reloj con 5 c. c. de agua. Se agrega, poco a poco, la solucion de cocaina. Despues de cinco minutos, los animales no resisten sino debilmente. Se agrega todavía medio centímetro cúbico de la solucion, i diez minutos mas tarde los animales mueren desplegados.

LADEWIG narcotiza los Briozoos ectoproctos por medio de la *cocaina* al 1 % agregada al agua de mar mui gradualmente.

CONSER mata las formas de agua dulce por medio de la *cocaína*, las pone durante una hora en el *ácido crómico* al 1 %, las lava i las pasa al alcohol, etc.

VERWORN se sirve de un método parecido para los Briozoos de agua dulce. Deja las colonias de *Cristatella* durante algunos minutos en una *solucion de cloral* al 10 %.

CONI encuentra que el cloral macera i emplea el *alcohol metílico* para *Cristatella*. Este reactivo ofrece, entre otras ventajas, la de no tener sino un poco de accion sobre las albúminas. Se hace una mezcla de 10 c. c. de alcohol metílico, i 90 c. c. de agua de mar o de agua dulce (si se elije ésta se agregan 6 gramos de cloruro de sodio). Se agrega esta mezcla por pequeñas cantidades al agua que contiene los animales, i si esto no es suficiente, se les inunda con la mezcla no diluida. Se puede agregar a la mezcla algunas gotas de cloroformo.

LO BIANCO se sirve para *Pedicellina* i *Loxosoma* del procedimiento del hidrato de cloral al 1 %, dejándolos en él una hora, i los fija al sublimado concentrado o frio, para lavarlos inmediatamente despues.

El mismo autor emplea el método del alcohol de EISIG para *Flustra*, *Cellepora*, *Bugula*, *Zoobothrium* i *Crisia*, añadiendo lentamente alcohol de 70° a la superficie del agua en que están (mezcla de 1 parte de alcohol de 70 % con 9 de agua de mar).

C—Braquiópodos

Lo Bianco narcotiza los Briaquiópodos dejándolos en agua de mar alcoholizada algunas horas, i ántes de pasarlos al alcohol, mete entre las valvas un pedacito de madera, para evitar que se cierren.

Los ejemplares pequeños se ponen directamente en alcohol de 70°.

VII

CELENTERADOS

A.—Nidarios

A la inversa de las Esponjas, que se sumerjen directamente en el alcohol de 70°, la mayor parte de los Nidarios fijos deben ser narcotizados i tratados ántes de sumerjirlos en el líquido conservador, pues están dotados de una contractibilidad estrema.

Todos los anestésicos pueden emplearse, i la fijacion se hace, en jeneral, matando el animal con una mezcla cromo-acética i endureciéndolos en seguida con el ácido crómico al $\frac{1}{2}$ o 1 %.

El manual operatorio, reconocido como el mejor, es el siguiente: 1.° estando el animal fijo en su soporte, se le amarra un hilo que permita sumerjir el todo en medio de una masa de agua bien pura, donde se produce la estension de las diversas partes del cuerpo (tentáculos, etc.) (1); 2.° se narcotiza como ha sido indicado mas

(1) «Sucede siempre que los animales, molestados por el aparejo al ser pescados o durante el trasporte, se contraen o se ocultan por completo; para hacerlos estenderse, basta dejarlos en una vasija con agua de mar limpia, o a veces es necesario tenerlos durante cierto tiempo en agua corriente. A menudo he observado que muchos se abren solamente despues de algunos dias de permanencia en la misma agua i cuando ésta empieza a corromperse» (=Lo Bianco).

arriba (paj. 103) 3.° o bien, despues de haber sacado tanta agua como es posible por medio de un pequeño sifon, se vierte bruscamente una gran cantidad del fijador (dos parte por una de agua),—o bien se sumerje directamente el animal en este líquido: frecuentemente no se le deja en el mismo mas que algunos instantes i se le imprime un lijero movimiento de rotacion;—4.° se sumerje el animal en el ácido crómico para endurecerlo; 5.° se pasa en los alcoholes de fuerzas crecientes, inyectándole, si es necesario, el alcohol de 70° en la cavidad del cuerpo.

Este método da buen resultado en los *Alcyonium*, las *Pennatulas*, las *Gorgonias*, las *Actinias* i los *Erizos*.

Los *Hidrarios*, el *Coral* i las *Madréporas*, se matan vertiendo en el agua de mar que los contiene, sublimado concentrado caliente, mezclado o no al ácido acético (un volúmen igual al del agua de mar, o la mitad ménos); despues se pasan al alcohol débil, miéntras se inyecta la cavidad gástrica.

Los NIDARIOS PELÁJICOS *(Medusas, Sifonóforos*, etc.), se tratan por métodos especiales. Se obtienen buenos resultados, agregando al agua de mar, un poco de formalina despues de la cocainizacion *(Lucernarias)* o no *(Tenóforos)*; se conservan en formalina al 4 %, o bien, al cabo de cierto tiempo, se les hace pasar al agua i a la serie de alcoholes.

—Daremos en seguida los detalles de los métodos usados para conservar los Nidarios mas importantes.

I.—ANTOZOOS o CORALARIOS

Actinias.—Los hermanos HERTWIG (1) narcotizan las Actinias por el método del humo de tabaco (véase páj. 105), las fijan inyectándoles ácido crómico al 1 % mezclado a algunas gotas de ácido

(1) *Jenaisch. Zeit.*, 1879.

ósmico i las sumerjen en el mismo líquido, despues de lo cual se lavan con agua i las conservan en alcohol de 75°.

Segun De Castellarnau el sublimado corrosivo caliente da buenos resultados. Para las pequeñas formas se emplea este reactivo de la manera corriente, inundando los animales. Para las formas mas grandes, es necesario inyectarlo en la cavidad del cuerpo. A este efecto, se llena con la solucion una jeringa de vidrio i se tocan lijeramente los bordes de la boca del animal con la punta de la cánula. Este contacto hace abrir la boca, se inyecta el líquido i con él se inunda en seguida el animal.

La mezcla de glicerina i alcohol de Salvador Lo Bianco da tambien buenos resultados en algunos casos.

Andres (1) ha empleado tambien con éxito la narcotizacion por el humo de tabaco i por la nicotina (2). El mismo autor ha obtenido buen resultado empleando el método de la conjelacion. El vaso que contiene las Actinias se pone en un recipiente lleno de una mezcla de hielo i de sal de cocina; dicho recipiente debe estar envuelto en algodon en rama. Una vez conseguida la conjelacion, se deshiela el block con los animales, en alcohol o en un ácido.

El cloroformo no sirve sino raras veces, porque la maceracion viene, en jeneral, ántes que se haya perdido la contractibilidad.

Zoantarios de esqueleto calcáreo.—Su fijacion es con frecuencia mui difícil a causa de la contractibilidad de los pólipos. Se aconseja matarlos i fijarlos por la inmersion brusca en el sublimado usado en caliente.

---

(1) *Le Attinie* etc.; *Intorno all' Edwardsia Claparedii.*

(2) Se sirve de una solucion de 1 gramo de nicotina en un litro de agua de mar. Coloca el animal en un bocal que contiene medio litro de agua i pasa la solucion de nicotina gradualmente por medio de un hilo en sifon. El grueso del hilo debe ser tal que pueda vaciar el litro de la solucion de nicotina en 12 horas.

De Castellarnau dice que este procedimiento da buen resultado para los *Dendrophyllia*, *Antipathes*, *Astroides*, *Cladocora* i *Cariophyllia*.

Alcionarios.—Los Pólipos son tambien estraordinariamente contráctiles i su fijacion se hace, en consecuencia, mui difícil.

Se recomienda en jeneral el sublimado usado en caliente.

Garbini (1) dice que se les puede fijar en posicion estendida inundándolos bruscamente con éter i pasándolos despues de algunos minutos al alcohol de 35°.

Wilson (2) fija los Alcionarios sumerjiéndolos en una mezcla de 1 parte de ácido acético fuerte con 2 partes de una solucion concentrada de sublimado. Los lava rapidamente i pone las piezas durante 2 o 3 horas en una solucion concentrada de sublimado, teniendo cuidado de inyectar los animales con la solucion todas las veces que sea posible.

Zoantarios i Alcionarios.—Braur (3) recomienda agregar al sublimado empleado para la fijacion, un poco de ácido ósmico. He aquí cómo procede para *Alcyonum palmatum*, *Sympodium coralloides*, *Gorgonia verrucosa*, *Caryophyllia cyathus i Polythoa axinellae*. Se deja los animales durante 1 o 2 dias en un pequeño recipiente de vidrio, de modo que pueda estenderse completamente. Despues se les inunda bruscamente en una mezcla de 20 a 25 c. c. de solucion concentrada de sublimado en agua de mar con 4 a 5 gotas de ácido ósmico al 1%. Despues de 5 minutos, se saca el líquido i se reemplaza desde luego por agua de mar i en seguida por los alcoholes sucesivamente mas fuertes.

---

(1) *Manuale*, p. 151.

(2) *Mith. Zool. Stat. Neapel*, 1884, p. 3.

(3) *Zool. Anzeig.*, 1886, p. 458.

Schultze (1) dice que para los *Pennatulidos* de pólipos voluminosos, la edicion gradual de agua dulce da buenos resultados.

II.—POLIPOMEDUSAS

Hidrozoos; formas polipoideas.—Los animales deben fijarse, en jeneral, con el sublimado concentrado i caliente. No se les tiene en este reactivo mas que un instante i se pasan al alcohol. La solucion debe usarse en frio para los *Jimnoblastos* i en caliente para la mayor parte de los *Caliptoblastos*. La narcotizacion puede hacerse por los métodos indicados en el capítulo respectivo (véase páj. 103).

Se ha visto emplear con éxito el éter *(Campanularias)*.

Las *Hidras* se fijan perfectamente con el ácido ósmico.

Breekenfeld (2) mata las Hidras dejándolas estenderse en una gota de agua colocada en un porta-objeto que mantiene en seguida durante 3 a 5 minutos sobre el tubo de una lámpara de parafina.

Medusas; fijacion.—Para narcotizarlas, el cloroformo da buenos resultados cuando se le emplea *agregado por pequeñas cantidades* al agua que contiene las Medusas, pues, frecuentemente se obtienen bellos ejemplares bien cloroformados en una actitud perfectamente estendida despues de una o dos horas. Conviene proyectar el cloroformo, por cantidades de pequeñas gotas a la vez, vigorosamente en el agua, con una pequeña jeringa o una pipeta provista de una pera de caoutchouc i con el orificio bastante pequeño para que el cloroformo sea pulverizado a la salida. Se repite la dósis cada 5 minutos hasta que el animal se haya inmovilizado.

La fijacion de las Medusas ofrecen algunas dificultades para

---

(1) *Biol, Centralb.*, 1887, p. 760.
(2) *Amer. Mon. Mic. Journ.*, 1884, p. 49.

las formas de tentáculos retráctiles, que se enroscan fácilmente en contacto de los reactivos.

Los mejores resultados se han obtenido por medio del procedimiento del ácido acético de VAN BENEDEN. El secreto del éxito para las especies de tentáculos largos depende de una maniobra, debida a LO BIANCO, que vamos a tratar de describir. Se pone en un cristalizador, mas bien profundo, una gran cantidad de ácido acético cristalizable. Se tiene el cristalizador con la mano izquierda (o bien con las dos manos si se dispone de un ayudante). Se hace jirar en círculo de modo que se imprima al líquido un movimiento rotatorio. Con la mano libre se toma en una cuchara una de las Medusas con la menor cantidad de agua que sea posible. Se le echa en el ácido en movimiento i se sostiene este movimiento regular de manera que se consiga estender bien los tentáculos hácia atras del animal llevado en la corriente circular. Se continúa así hasta que el animal haya muerto i se pasa al alcohol de 50%. No hai que pretender fijar mas que un animal a la vez, al ménos ántes de haber adquirido cierta práctica; tampoco conviene pasar mas de uno en la misma cantidad de alcohol, pues, estando varios juntos, sus tentáculos pueden fácilmente entrecruzarse.

Es bueno, segun LO BIANCO, someter a *Oceania conica* i *Tiara* a una narcotizacion previa por medio de alcohol al 3% en agua de mar.

Se recomienda evitar en todo caso el líquido de Kleinenberg para la fijacion de esta clase de organismos.

Las formas que no tienen tentáculos mui contráctiles pueden fijarse fácilmente por el sublimado o por un líquido ósmico o crómico. La *Cassiopeia* demanda, segun DE CASTELLARNAU, un tratamiento particular que consiste en tratar los animales por el ácido ósmico hasta que comiencen a cambiar de color, ponerlos despues durante dos o tres dias en bicromato de potasio al 5%, i, finalmente, en alcohol. Se ha ensayado este procedimiento con mui buenos resultados.

Sifonóforos.—Para narcotizar los Sifonóforos, KOROTNEFF emplea el *vapor* de cloroformo. Se espera que los animales se muestren un poco tranquilos en el frasco que los contiene. Se hace flotar entónces sobre el agua un vidrio de reloj que contenga cloroformo i se cubre el todo con una campana. El cloroformo adormece a los animales, que mueren estendidos, i se les fija por diversos procedimientos.

BEDOT (1) da las siguientes instrucciones:

Se hace una solucion de sulfato de cobre de 15 a 20% en agua destilada. (El grado de concentracion puede variar un poco segun la especie con que se manipula). Despues se echa de repente en esta solucion la colonia de animales que se quiere fijar. Operando de esta manera hai que verter al mismo tiempo que el Sifonóforo una gran cantidad de agua de mar. Será, pues, preciso arreglarse de manera que la solucion de sulfato de cobre represente un volúmen casi diez veces mayor que el del agua de mar. Una vez que el Sifonóforo está fijado (lo que tiene lugar al cabo de algunos minutos), se agrega a la solucion algunas gotas de ácido nítrico i se le revuelve suavemente con una varilla de vidrio, a fin de impedir la formacion de precipitados.

Se deja el Sifonóforo durante cuatro o cinco horas en ésta solucion, despues de lo cual conviene endurecerlo ántes de ponerlo en el alcohol. Se podrá hacer uso para ésto de diferentes reactivos endurecedores. Los mejores resultados se han obtenido empleando el líquido de FLEMMING, compuesto de 15 partes de ácido crómico al 1%, 4 partes de ácido ósmico al 2%, i 1 parte de ácido acético glacial. Como conviene no sacar el Sifonóforo ni cambiar el jarro ántes de su endurecimiento completo, se opera de la siguiente manera: Se saca una parte de la solucion de sulfato de cobre, dejando sólo una cantidad suficiente para que el Sifonóforo quede todavía sumerjido. Despues se vierte suavemente el líquido de FLEMMING,

(1) *Arch. des Sci. Phys. et Nat.*, 1889, p. 556.

que se deja obrar durante 24 horas a lo ménos. El volúmen del líquido de FLEMMING debe ser casi el doble del de la solucion de cobre.

La operacion mas importante, en la conservacion de estos animales, es el paso al alcohol, que debe ser excesivamente lento i gradual. Se comienza por agregar al líquido en el cual se encuentra el Sifonóforo, algunas gotas de alcohol de 25 % que se vierte, con una pipeta, lo mas lejos posible de la colonia. Despues se aumenta progresivamente la dósis i la concentracion del alcohol. Esta operacion debe durar a lo ménos 15 dias ántes que se pueda emplear el alcohol de 70 %. La conservacion definitiva se hará en alcohol de 90°.

Ensayando este procedimiento de BEDOT, se puede constatar que tiene la preciosa propiedad de conservar las piezas *sin ninguna desarticulacion de los apéndices, sean Pólipos o Campanas natatorias*, resultado que es imposible obtener con los métodos ordinarios.

FRIEDLAENDER (1) fija los Sifonóforos i otros animales pelájicos delicados, cubriéndolos con una mezcla de 125 partes de sulfato de cobre, 125 de sulfato de zinc i 100 de agua.

LO BIANCO se sirve para la mayoría de los Sifonóforos de una mezcla de 100 centímetros cúbicos de una solucion de sulfato de cobre al 10 %, con 10 de una solucion saturada de sublimado, i la usa de la misma manera que BEDOT. Sin embargo, él mata los *Diphyes*, *Rhizophysa* i *Physalia* en soluciones de sublimado; *Velella*, en el ácido crómico o en una mezcla de 100 centímetros cúbicos de solucion de sublimado con 50 centímetros cúbicos de ácido crómico al 1 °/₀; *Porpita*, por envenenamiento en el líquido de Kleinenberg.

DAVIDOFF (2) prepara los Sifonóforos como sigue:—Se ponen los animales vivos en un tubo de vidrio (gran tubo de ensayes)

---

(1) *Biol. Centralb.*, X, 1900, p. 483

(2) *Anat Anz.* XI, 1896, p. 505.

lleno de agua de mar, se tapa el tubo con algodon en rama i se le coloca boca abajo, en una posicion un tanto inclinada, en un recipiente lleno hasta la mitad de formalina al 6 u 8 °/₀. La formalina, mas lijera que el agua de mar, pasa por difusion en el tubo, i al cabo de una hora, mas o ménos, mata los animales en estension i con poca desarticulacion de las campanas. Se les puede conservar definitivamente en la misma formalina, o se les endurece por medio de otros reactivos.

Despues de las hermosas preparaciones de Weber, se puede decir que la conservacion definitiva de los Sifonóforos, despues de la fijacion i el lavado, se hace perfectamente bien en la formalina, lo que simplifica mucho las operaciones.

III.—TENÓFOROS

Las pequeñas especies se fijan mui fácilmente. Se puede emplear el sublimado, el ácido ósmico o el ácido crómico.

Para *Beroe forskalii,* recomienda Lo Bianco la mezcla cúprica que se usa para los Sifonóforos. Conviene saber, sin embargo, que el sulfato de cobre no es bueno para todos los Tenóforos, pues hai algunos que se ponen opacos i tan pesados, que se rompen por su propio peso.

Lo Bianco trata la mayor parte de las especies con una mezcla de 100 partes de ácido crómico al 1 °/₀ con 2 partes de ácido ósmico al 100 p. 1; *Cestus veneris,* por el ácido cromo-acético (es preciso tener cuidado de enrollar el animal en un cristalizador como una cuerda de reloj para que no se deforme por su propio peso, haciéndole que apoye del lado opuesto a la boca sobre el fondo): a los 10 minutos se lava con agua dulce i con mucho cuidado se va cambiando sucesivamente el alcohol.

B.—Esponjiarios ó Poríferos

Para preparar las esponjas no se necesita narcotizarlas sino fijarlas empleando el ácido ósmico, el líquido de Kleinenberg, el sublimado, etc., o el alcohol absoluto. Este último reactivo es el que mejor se presta para el objeto.

Para las esponjas destinadas a ser conservadas en coleccion basta la inmersion directa en alcohol de 70°.

En todo caso, conviene pasar las piezas rápidamente al alcohol relativamente fuerte, pues los tejidos de las esponjas se maceran con gran facilidad en los medios acuosos.

Cuando las esponjas son mui voluminosas se cortan en pedazos con un cuchillo bien afilado i se tratan de la misma manera. Para preparar su esqueleto se lavan primero con agua dulce durante un par de horas, despues se dejan todo un dia en alcohol ordinario i, finalmente, se ponen al aire i al sol.

Si se quiere limpiar las espículas silíceas, se les trata en caliente por el ácido nítrico o el clorhídrico concentrado, o por una fuerte solucion de potasa o de soda cáustica.

VIII

PROTOZOOS

Infusorios i Rizópodos.—Se obtienen buenas preparaciones de *Infusorios*, dejando caer en el vidrio de reloj donde se encuentran, algunas gotas de ácido ósmico al 1 %, lavándolos despues en el agua destilada i en seguida en alcohol débil.

Se sumerjen los *Foraminíferos* en una solucion acuosa de ácido pícrico, saturado en frio, i los *Radiolarios* se echan ya sea en ácido crómico al $\frac{1}{2}$ o al 1 % durante una hora o en alcohol de 35 % iodado, durante 15 minutos a lo ménos. Se lavan i se pasan despues en la serie de los alcoholes hasta el de 70°.

CERTES (1) espone, durante 10 a 30 minutos, a los vapores de ácido ósmico, los Infusorios colocados sobre una *lámina de vidrio*. Para los Infusorios mui contráctiles, deposita una gota del reactivo sobre la lámina ántes de recubrir la gota de agua que los encierra.

PFITZNER (2) emplea una solucion concentrada de ácido pícrico que hace llegar *por capilaridad debajo del cubre-objetos.*

GÉZA ENTZ (3) agrega algunas gotas de líquido de Kleinenberg al agua que contiene los animales *en un vidrio de reloj.*

KORSCHELT (4) emplea de la misma manera el ácido ósmico al 1 °/₀, o para las Amibas, el ácido crómico al 2 °/₀.

LANSBERG (5) *pasa al fijador los animales vivos con la ayuda de una pipeta.*

CATTANEO (6) somete los Infusorios a la accion de los reactivos *sobre el porta-objetos.* Los mejores fijadores son, segun él, el cloruro de paladio en solucion acuosa al 1-3°/₀, i el cloruro doble de oro i de cadmio al 1 °/₀.

BRASS (7) emplea el líquido siguiente:

Acido crómico..............	1 parte
Cloruro de platino.........	1 »
Ácido acético...............	1 »
Agua..........................	400 a 1000 partes

Para los Protozoos que se vuelven opacos por las materias nutritivas, se ha adoptado el método siguiente: se colocan los ani-

(1) *Comptes rend. de l' Acad. d. Sc.*, 1.er sem. 1879, p. 433.
(2) *Morph. Jahrb.*, XI, 1885, p. 454.
(3) *Zool. Anz.*, IV, 1881, p. 575.
(4) *Idem*, p. 336.
(5) *Bolletino scientifico*, N.os 3 i 4, 1885,
(6) *Zeit f. wiss. Mik.*, 1884. p. 39.

males en el líquido de Kleinenberg durante tres o cuatro minutos i despues en agua con una pequeña cantidad de amoniaco, en la cual vuelven a tomar sus dimensiones i formas naturales; se neutraliza el amoniaco con un poco de ácido acético i se colora con el carmin amoniacal. Se lava i se examina en la glicerina diluida. Los objetos así tratados se vuelven bien trasparentes

Brass ha obtenido tambien buenos resultados con una solucion de sublimado.

Waddington (1), para poner en evidencia los cilios de los Infusorios, los fija con algunas gotas de una solucion de tanino, o por una pequeña cantidad de una solucion alcohólica de ácido sulfuroso.

Du Plesis (2) los fija por el sublimado al 0,2 %, deja que la preparacion se seque espontáneamente, i si los organismos conservan sus formas, colora i monta el preparado con bálsamo de Canadá.

Zoograf trata los Rizópodos i los Infusorios como los Rotíferos (páj. 125), pero sin narcotizarlos.

Lo Bianco fija las *Gregarinas* por el ácido picro-sulfúrico (una hora), las *Vorticelas*, por el sublimado caliente, las *Acinetas*, por el sublimado diluido en el agua de mar, o por el ácido ósmico, *Thalassicola*, por el ácido crómico al 0,5 % (una hora), las *Acanthometra* i *Aulacantha*, por el alcohol al 50 %, o el sublimado concentrado, o agregando un poco de ácido ósmico al agua que los contiene. Lo Bianco trata los Sphaerozoides como Brandt, que viene en seguida.

Brandt fija los *Sphaerozoides*, segun las especies, por el ácido crómico de 0,5 a 1 % (media hora a una hora), o por una mezcla de partes iguales de agua de mar i de alcohol al 70 % con un poco de tintura de iodo (un cuarto de hora a media hora) o por el sublimado de 5 a 15 % en el agua de mar.

---

(1) *Journ. R. Microsc.* Soc., III, 1883, p. 185.

(2) *Traité Anat. Comp. Prat.*, de Vogt. et Jung, p. 92.

B.—VEJETALES (ALGAS)

La preparacion de los vejetales que viven completamente su merjidos en el agua, es mui sencilla; consiste esencialmente en estender la planta bajo el agua i en recojerla sobre una hoja de papel bueno i fuerte, sobre la cual se pega naturalmente cuando se pone en la prensa.

Para preparar convenientemente las Algas i conservarlas con toda su belleza, se debe disponer de un vaso ancho i poco profundo lleno de agua, en el cual se coloca la planta (Fig. 5); des-

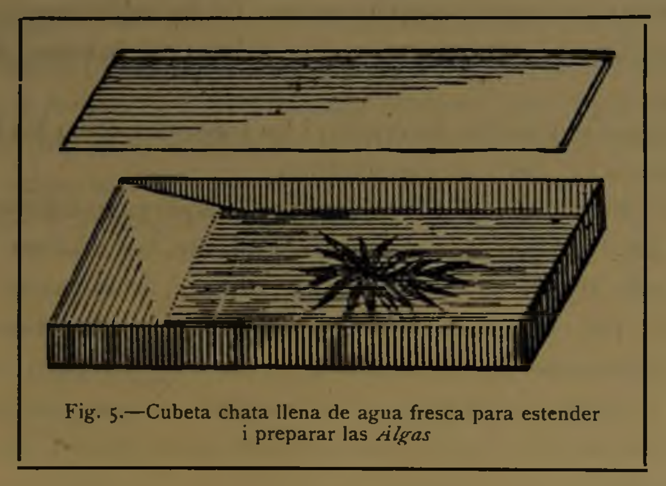


Fig. 5.—Cubeta chata llena de agua fresca para estender i preparar las *Algas*

pues, por medio de una aguja larga o espinas de quisco, se separan con cuidado los filamentos para que tomen su posicion natural. Se introduce entónces en el agua, se desliza debajo de la Alga flotante una hoja de papel grueso (Fig. 5), i en seguida, sosteniendo la planta con un dedo en una de las estremidades de la hoja de papel, se inclina ésta lijeramente i se la retira con cuidado del agua con el Alga que la recubre, teniendo la precaucion de mover otra vez los filamentos, de tal manera que queden sobre el papel en la actitud que tienen naturalmente; el pedazo de papel con el

Alga se pone algunos instantes sobre una plancha inclinada; en seguida, recubierta de una hoja de papel untado con aceite bien secado, se coloca en una hoja doble de papel de estraza i se somete a una presion lijera. Todas las especies deben ser tratadas de la misma manera, pero hai que tener presente que la presion sea proporcionada a su resistencia; todas se adhieren naturalmente al papel sobre el cual se colocan.

En este punto conviene traducir el siguiente artículo que trata de la recoleccion de las Algas marinas i de agua dulce i que aparece publicado, en Febrero de este año, en la *Revista Chilena de Historia Natural.* (1) «Las Algas se encuentran en todas las partes donde hai luz i humedad. Unas son especiales a las aguas saladas (algas marinas), otras se hallan en las aguas dulces, sobre las rocas, la tierra húmeda, la corteza de los árboles o sobre las hojas coriáceas.

«Las Algas marinas, de formas variadas, a veces de una suprema elegancia i de una maravillosa riqueza de colores, son mas abundantes i están mejor representadas en una rejion en que las rocas sobre las cuales crecen son ménos quebradizas, lo que les permite fijarse mas solidamente. Es por esta razon que las playas de arena i los guijarros arrojados por las olas son siempre pobres en Algas. Las costas rocosas, resguardadas de los grandes golpes de mar, de anfractuosidades profundas, se prestan siempre mui bien para ser esploradas con éxito. Las playas deben ser visitadas despues de las tempestades, que arrastran a ellas plantas interesantes.

«Los pantanos salados, los estanques salobres del litoral, las salinas del interior, las fuentes termales, se aproximan por sus producciones a la flora de las Algas marinas i deben ser objeto de las mismas rebuscas.

«Las Algas de agua dulce, en oposicion a las Algas marinas

---

(1) MANGIN (LOUIS), *Instructions pour la récolte des Algues marines et d'eau douce.*

tienen jeneralmente mui pequeñas dimensiones. Son raras en las aguas sombrías, i por el contrario, se encuentran en abundancia en los rios cuyo curso es moderado, en las cascadas, en las grietas de las rocas graníticas, en la turba de los pantanos i en las compuertas del canal de los molinos. Los rios, los lagos, los grandes estanques suministran escasos materiales. Es preciso no olvidar de esplorar las fisuras de las rocas húmedas, las paredes de las rocas por donde se recala el agua, los matorrales húmedos, etc. Los musgos, las hepáticas, las anchas placas de Líquenes, las hojas coriáceas en los paises calientes, tampoco deben descuidarse.

«Las conchas marinas i de agua dulce i las rocas calcáreas estan con frecuencia invadidas por Algas.

La superficie de los mares i de los pequeños estanques aparecen frecuentemente recubierta de una capa verde o azulada debida a las *Flores de agua;* las mismas localidades pueden estar a veces teñidas de un brumo-rojizo por la abundancia de las Peridíneas. Los campos de nieve de las altas montañas están coloreados por las Algas microscópicas que constituyen la *nieve roja* i la *nieve verde.*

Las orillas de los rios i de los mares, la tierra húmeda de donde el agua se retira, abundan en Diatomáceas que les comunican un tinte ferrujinoso. Las Diatomáceas, están igualmente mui repartidas sobre las rocas marítimas i sobre las Algas arrojadas a la playa. El colector debe recojer, para el estudio de las Diatomáceas, el limo del fondo que se adhiere a las anclas de los navíos. Los travertinos, las margas, los trípolis i las cinéritas encierran un verdadero mundo de Diatomáceas fósiles.

«Los Sphagnums de las turbas están habitadas por innumerables Desmidiáceas».

I.—*Algas marinas.*—Las algas de grandes dimensiones pueden secarse directamente entre hojas de papel de estraza, como se hace con las fanerógamas. Las demas, siempre que sea posible, se preparan sobre papel engomado de la manera siguiente: se

toma un gran plato o una cubeta chata de fotografía en la que se coloca en agua de mar fresca una muestra; se desliza luego por debajo de la planta una hoja de papel engomado sobre la cual se estiende el alga con todo el cuidado posible. La planta así dispuesta sobre el papel, se coloca sobre un papel secante i se cubre con un trozo de indiana. Se pone sobre todo un cojinete de papel secante, sobre el cual se pueden colocar otros vejetales preparados de la misma manera i se coloca en la prensa. Se deben cambiar frecuentemente los trozos de indiana i los cojinetes hasta que la disecacion sea completa. Cuando no se tiene a disposicion agua de mar, se agrega al agua ordinaria 100 grs. de sal marina por litro.

«Este procedimiento de preparacion —el mejor de todos sin disputa— no es siempre practicable. En este caso se deben secar las algas a la sombra, en una corriente de aire libre. sobre el suelo o sobre una cuerda tendida. Se puede tambien juntar las algas en sal marina operando como sigue: se destilan cuidadosamente las plantas que se quiere conservar, i se las dispone en un vaso de abertura ancha o en otro recipiente sobre sal bien seca, alternando las capas de algas i de sal.

Insistimos en este hecho que la sal debe estar bien seca i las algas bien destiladas, pues es preciso evitar a toda costa que éstas plantas se bañen en una salmuera que las deterioraría.

II.—*Algas de agua dulce.*—Las algas de agua dulce deben secarse directamente sobre papel engomado, con cojinetes i trozos de indiana si son de grandes dimensiones; las de pequeña talla deben secarse al aire libre sobre papel engomado, sin cojinetes ni indiana.

«Las algas terrestres que forman costras mas o ménos desarrolladas, deben separarse de la tierra con un cuchillo, de manera que se obtenga una placa de igual espesor en todas sus partes, la que se dejará secar rapidamente para colocarla en seguida en un saquito. De la misma manera se secarán al aire libre las algas de las heladas, tales como los *Nostoc.* Es el único procedimiento que da buenos resultados para un estudio ulterior.

Las Diatomáceas, de las cuales ya hemos hablado ántes, serán colocadas en pequeños tubos. Se pondrán en saquitos las conchas, los pedazos de roca habitados por las algas, los guijarros que aparecen coloreados por la presencia de estos vejetales, las Melobecieas (Marl, Maerl), que forman las aglomeraciones calcáreas teñidas de rosado o rojo cuando están frescas. Las Desmidiáceas, lo mismo que las Diatomáceas, no son visibles a la simple vista. Recomendamos a los colectores que encuentren Sphagnums, que espriman con la mano los paquetes de éstos musgos de las turbas, para recojer el agua en un vaso i colocar i estender el depósito sobre una hoja de papel engomado o bien conservar este depósito en un tubo con alcohol.

«En cuanto a las Peridíneas, se las encuentra en la mayoría de las redes finas cuando se pesca bajo el punto de vista del estudio del Plankton marino i de agua dulce. Pero es preciso ser especialista para dedicarse a ésta clase de rebuscas. Aconsejamos a los que se interesan por esta clase de estudios que dividan en dos partes el producto de sus pescas: una destinada al estudio de los animales marinos, que lo hará un zoólogo, i otra al de las Peridíneas, Diatomáceas, etc., que corresponde de derecho a los botánicos.

«¿Se deben conservar las Algas en un líquido? La cuestion merece ser estudiada de cerca. Desde luego, es preciso *condenar desapiadadamente el uso de la formalina, bajo cualquier forma i dósis que sea;* los resultados de su empleo han sido siempre deplorables. Trajimos una vez en una solucion de formalina material botánico que era de gran interes para la Algolojía, i se deterioró de tal manera que nos vimos obligado a dejarla a un lado.

«El alcohol de 95°, o mejor el alcohol mezclado con un poco de glicerina i la solucion saturada de ácido pícrico, pueden utilizarse mui bien, el primero para la conservacion de los fragmentos de las algas marinas destinadas a un estudio ulterior, la segunda para las algas verdes de agua dulce.

Mui bueno es, bajo todos los puntos de vista, el siguiente

procedimiento que se emplea para los materiales que se quieren conservar en alcohol o ácido pícrico: se disponen las Algas o sus fragmentos en saquitos que llevan un número de órden i están acribillados de agujeros, de manera que las muestras se embeben completamente. Se colocan varios de estos saquitos en un recipiente que acaba por llenarse con algodon en rama, de manera que no quede líquido libre. Cuando se hace uso del alcohol, se puede tambien recojer el líquido en exceso; quedará siempre bastante para asegurar la conservacion de las muestras. Las Algas trasportadas en estos diferentes líquidos no pueden servir como muestras de herbario, pero podrán dar excelentes indicaciones para los estudios de laboratorio.

«Encargamos tambien hacer ensayos con la solucion saturada de sal marina (250 grs. por litro de solucion).

Las algas preparadas o conservadas deben ir acompañadas de las siguientes indicaciones: número de órden, fecha de la colecta, localidad, substratum (mar, agua dulce, tierra, corteza de árbol, etc.), colecta hecha en el mismo lugar (muestra tomada donde vive i tal como está fijada) o bien en la playa (muestras arrastradas i frecuentemente descoloridas). Estas indicaciones deben reproducirse en una libreta de apuntes.

«Los Bacterios (microbios) se consideran como pertenecientes al grupo de las Algas por la mayoría de los botánicos, pero su recoleccion es del todo especial i exije tantas precauciones que no trataremos de ellas. Encargamos, sin embargo, a los esploradores que tengan ocasion de encontrar bebidas fermentadas, que se procuren los materiales que sirven para su fabricacion (levaduras acompañadas de bacterios), jugos o estractos de plantas, etc., i que los envien tan pronto como sea posible a un laboratorio donde puedan estudiarlos.»

B. Q. B.

